Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 37, No. 1, Spring 2023, p. 219-229

Engineering of Secondary Metabolites in Cell Suspension Culture of *Citrullus colocynthis* (L). Schrad. with the Presence of Biological and Non-biological Stimulants

M. Sohrabi[1], D. Samsampour[2*], A. Bagheri[3]

Received: 16-02-2022 Revised: 16-04-2022 Accepted: 02-05-2022 Available Online: 02-05-2022	**How to cite this article:** Sohrabi, M., Samsampour, D., & Bagheri, A. (2023). Engineering of secondary metabolites in cell suspension culture of *Citrullus colocynthis* (L). Schrad. With the presence of biological and non-biological stimulants. *Journal of Horticultural Science* *37*(1): 219-229. (In Persian with English abstract). http://doi.org/10.22067/jhs.2022.75356.1142

Introduction

Medicinal plants have historically been one of the main sources of medicine and pharmacy in most parts of the world, that among these plants, we can mention the species *Citrullus colocynthis* L. Schrad. Cell suspension culture is a widely used method to increase the rate of secondary metabolites. The secondary metabolites of plants, are species compounds often produced during a certain period of growth and development and have important ecological functions in plants. They induce the ability of plants to cope with herbivores, microbial pathogens, adsorbents, and seed-spreading organisms. Also, due to the role of fungal elicitors to increase the rate of secondary metabolites in plants, in this study, we studied the role of the endophytes *Alternaria solani*. *Fusarium* sp. and *Setosphaeria rostrata* extracted from *Citrullus colocynthis* L. Schrad were collected from different regions of Hormozgan province as bio-elicitors in a cell suspension culture medium.

Materials and Methods

The study was performed based on a factorial experiment in a completely randomized design with two factors (the first factor had two levels of different hormonal composition and the second factor had eight levels of endophytic fungal extracts) with three replications in the biotechnology laboratory of Hormozgan University and the results were analyzed statistically using SAS 9.4 software. To produce the callus and culture of cell suspension under hormone treatment, watermelon seeds were first disinfected for a period of time and then the seeds were transferred to a culture medium containing MS and placed in a suitable incubator for seed germination. After germination and leaflet production, pieces with an area of approximately 1 mm^2 were separated from the primary leaves and for callus formation were transferred to Petri dishes containing MS medium (3% sucrose, 0.8% agar), with two levels of 1mg 2,4-D + 1mg BA and 1mg 2,4-D + 1mg kin and placed in a suitable incubator for three weeks. Three fungal endophytes Alternaria solani, Setosphaeria rostrata, and Fusarium sp. were transferred separately to PDA (Potato Dextrose Agar) culture medium to prepare the bio elicitor and placed at 30 ° C for 7 days. From 7-day cultures, 1 cm^2 of mycelium was isolated and inoculated into 150 ml of PDB (Potato Dextrose Broth) culture medium. The cultured cells were stored at 30 ° C in a 500 ml Erlenmeyer flask and placed on a shaker for 7 days at 120 rpm. The fungal cells were isolated and dried at 65 ° C for 24 hours. The powder from the dried cells was dissolved in water (10 g / l) and autoclaved for 20 minutes at 121 ° C. The extracts of these cells were finally used as a bio elicitor to study the change in the number of secondary metabolites. After that, the growth rate of cells in cell suspension culture was measured before and

1 and 2- M.Sc. and Associate Professor Horticulture Sciences Department, Faculty of Agriculture and Natural Resource, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran
(*- Corresponding Author Email: samsampoor@hormozgan.ac.ir)
3- Associate Professor of Plant Protection Research Department, Hormozgan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research Education and Extension Organiziation (AREEO), Bandar Abbas, Iran
DOI: 10.22067/jhs.2022.75356.1142

after the application of fungal extract. Parameters such as total phenol content, antioxidant activity, and flavonoids were also studied.

Results and Discussion

The results showed that the treatment combinations of 1mg 2,4-D + 1mg BA and inoculation of the plant with three fungi, the amount of phenol and flavonoids increased by 62.11% and 49.18%, respectively, compared to the control and at the levels of 1% and 5% probability were significant and was observed in the combination of hormonal treatment 1mg 2.4-D + 1mg Kin and inoculation of three fungi, the amount of antioxidant production increased by 62.78% compared to the control and at the levels of 1% probability was significant. The results indicated that the cell extraction of the fungal endophyte *Alternaria solani*, *Fusarium* sp., and *Setosphaeria rostrata* under condition hormonal treatment can be used as an effective stimulant in increasing the amount of secondary metabolites (phenol, flavonoids and antioxidant) of *Citrullus colocynthis* L. Schrad.

Conclusion

It was revealed that by adding the elicitor to the culture medium, cell growth was increased. The results showed that the combination of three types of endophytic fungi *Alteynaria solani*, *Setosphaeria rostrata* and *Fusarium* sp. led to a significant increase in cell dry weight compared with the control treatment. Also, an increase in cell growth was observed even when a fungal extract was used alone. The amount of metabolites in cells treated with fungal extracts (fungal elicitors) was significantly higher than metabolites produced in the control. According to the results of this experiment, using a combination of three fungal extracts was the best treatment to increase the metabolite production in the culture of cell suspension of *Citrullus colocynthis* L. Schrad.

Keywords: Cell suspension, *Citrullus colocynthis* L. Schrad, Elicitor, Endophyte, Secondary metabolite

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۷، شماره ۱، بهار ۱٤۰۲، ص. ۲۲۹-۲۱۹

مهندسی متابولیت ثانویه در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی هندوانه ابوجهل (*Citrullus colocynthis* (L). Schrad.) با حضور محرک زیستی و غیر زیستی

معصومه سهرابی[1]- داود صمصام پور[2]*- عبدالنبی باقری[3]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۷
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۱/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۱۲

چکیده

گیاهان دارویی در طول تاریخ جزء منابع اصلی پزشکی و داروسازی در اکثر نقاط جهان بوده‌اند. از جمله این گیاهان می‌توان به هندوانه ابوجهل با نام علمی .*Citrullus colocynthis* (L). Schrad اشاره کرد. کشت سوسپانسیون سلولی یکی از موثرترین و پرکاربردترین روش‌ها برای بررسی میزان تغییرات متابولیت‌های ثانویه است. همچنین با توجه به نقش الیسیتورهای قارچی در افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه، از قارچ‌های اندوفیت *Alternaria solani*، *Fusarium* sp. و *Setosphaeria rostrata* استخراج شده از گیاه هندوانه ابوجهل (جمع آوری شده از استان هرمزگان) به عنوان الیسیتور زیستی در محیط کشت سوسپانسیون سلولی استفاده شد. این مطالعه بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو عامل (عامل اول شامل دو سطح ترکیب هورمونی مختلف و عامل دوم نیز هشت سطح از عصاره قارچ‌های اندوفیت) با سه تکرار در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه هرمزگان انجام شد. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار تنظیم کننده رشد × عصاره قارچی نشان داد که در شرایط ترکیب تیماری هورمون 1mg 2,4-D + 1mg BA و تلقیح توام گیاه با سه قارچ، میزان فنول و فلاونوئید به ترتیب ۶۲/۱۱ و ۴۹/۱۸ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت و در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد معنی دار بود، اما فعالیت آنتی‌اکسیدانی به میزان ۶۲/۷۸ درصد در ترکیب تیمار هورمونی 1mg 2,4-D + 1mg Kin و تلقیح توام سه قارچ نسبت به شاهد افزایش نشان داد و در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود. بطورکلی نتایج نشان داد که برهمکنش قارچ و هورمون می‌تواند نقش موثری در افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه گیاه دارویی هندوانه ابوجهل داشته باشد. این کار از طریق فعال کردن مسیرهای هورمونی انجام می‌شود که در تولید متابولیت‌های ثانویه نقش دارند.

واژه‌های کلیدی: الیسیتور، اندوفیت، سوسپانسیون سلولی، متابولیت ثانویه، هندوانه ابوجهل

مقدمه

گیاهان دارویی به واسطه دارا بودن ترکیبات شیمیایی و متابولیت های ثانویه با ارزش، از سالیان دراز به عنوان منبع ارزشمندی برای درمان و دیگر کاربردهای پزشکی مورد استفاده قرار گرفته و هم اکنون حجم وسیعی از داروها، دارای منشا گیاهی هستند (Bensaddek *et al*., 2008). همچنین طبق مشاهدات محققین (Bensaddek *et al*., 2008) متابولیت‌های ثانویه گیاهان، منحصر به گونه یا حتی نژاد آن، اغلب در طی یک دوره رشد و نموی خاص تولید می‌شوند و دارای عملکرد اکولوژیک مهم در گیاهان هستند. این دسته از ترکیبات، در حفاظت گیاهان در مقابل

۱ و ۲- کارشناسی ارشد و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: samsampoor@hormozgan.ac.ir)
۳- استادیار گروه تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی هرمزگان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

DOI: 10.22067/jhs.2022.75356.1142

گیـاهخواران، عوامـل بیماری‌زای میکروبی، جذب گـرده افشـان‌هـا و جـانوران منتشر کننده بـذر، رقابـت گیـاه بـا گیـاه و همزیسـتی گیـاه بـا میکروب، نقش دارند. متابولیت‌هـای ثانویـه بـه عنـوان دارو، علف کش‌های زیستی، عوامل طعم دهنده، رنگ‌های طبیعی، سـم‌هـا، مواد توهم‌زا (مانند کوکائین، هروئین ، مورفین) کاکوئین و عطرهـا، در زیست فناوری مـورد توجـه قرار گرفته است. با توجه بـه مشـاهدات، مقدار این ترکیبات در گیاهان دارویی نسبتاً کم می‌باشد و امروزه برای افزایش تولید آن از تکنیک‌های ویژه‌ای از جمله کشـت بافـت بیشـتر استفاده می‌شود (Lam, 2007). با توجه به رشد چشـمگیر و افـزایش تمایل در مصرف داروهای گیاهی و ترکیبـات مـوثره آن‌هـا، بـه نظر می رسد که تکنیک کشت سوسپانسـیون سـلولی بـه عنـوان یکـی از چشم اندازهای آینده، در صنعت گیاهان دارویی به حساب خواهد آمـد. تکنیک کشت سوسپانسیون سلولی یکی از موثرترین و پرکـاربردترین روش‌ها برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه اسـت. کشـت سـلول گیاهی منبع جایگزینی بـه جـای اسـتفاده از کـل گیـاه بـرای تولیـد متابولیت‌های ثانویه است. یکـی از مزیـت‌هـای روش کشـت سـلول، مستقل بودن از تغییرات جغرافیایی و عوامل محیطی و در عـین حـال با سرعت بالای رشد می‌باشـد. در ایـن روش ممکـن اسـت ترکیبـات جدیدی تولید شود که در شرایط طبیعی در گیاه مادری وجـود نداشـته باشند. اولین و مهم‌ترین چالش تولید متابولیت‌ها با استفاده از تکنیـک کشت سلول، عملکرد پایین و تجمع کم متابولیت‌ها در سـلول‌هـای از تمایز خارج شده است (Bensaddek *et al*., 2008). در تعداد زیـادی از گیاهان دارویی این روش، بهینه شـده و امـروزه نیـز بـا اسـتفاده از بیوراکتورها توانسته اند حجم تولید را به مقدار قابـل تـوجهی افـزایش دهند (Bensaddek *et al*., 2008). بر اساس مشاهدات محققین بـه منظور افزایش تولید انواع متابولیـت‌هـای ارزشـمند در گیـاه دارویـی، مهندسی‌های متابولیت فراوانی انجـام شـده اسـت کـه یکـی از ایـن روش‌ها استفاده از الیسیتورهاست (Zhao *et al*., 2005). الیسیتورها ترکیباتی با منشا زیستی و یا غیرزیستی هسـتند کـه از طریـق القـای پاسخ‌های دفـاعی باعـث بیوسـنتز و انباشـت متابولیـت‌هـای ثانویـه می‌شوند. با توجه به مشاهدات محققین الیسـیتورهای زیسـتی شـامل پلی‌ساکاریدها، پروتئین و گلیکوپروتئین‌ها و یا قطعـات دیـواره سـلول قارچ‌هـا، گیاهـان (سـلولز و پکتـین) و میکروارگانیسـم‌هـا (کیتـین و گلوکـان) مـی‌باشـد (Vasconsuelo and Boland, 2007). الیسیتورهای زیستی ممکن است مانند کیتین و کیتوزان دارای ترکیب مشخص باشند و یا مانند میسیلیوم قارچ و عصاره مخمر دارای ترکیب زیسـتی نامشـخص باشـند. بـه طـور کلـی استفاده از الیسـیتورها در پژوهش‌های مربوط به زیست فناوری متابولیت‌های ثانویه گیـاهی دو هدف اصلی را دنبال می‌کنـد: نخسـت کسـب یافتـه‌هـایی در زمینـه مسیرهای بیوسنتزی که منجر به تشکیل و تنظیم متابولیت‌های ثانویه می‌شود. دوم افزایش تولید متابولیت‌ های ثانویه در راستای کاربردهای تجاری می‌باشد (Esmaeilzadeh Bahabadi, 2011).

الیسیتورهای قارچی برای ارتقای سنتز ترکیبـات مهـم تجـاری از محیط کشت سلول‌های گیاهی به صورت وسیع‌تری مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. قارچ‌هایی که معمولاً باعث پاسخ‌هـای فـوق حساسـیتی در سلول‌های گیاهی می‌شوند، باعث فعال شدن مسیرهای دفاعی گیاهی شده و منجر به افـزایش تولیـد فیتوالکسـین مـی‌شـود (Bonfante, 2009). و همچنین با کشف *Piriformospora indica*، یـک قـارچ اندوفیت که توانایی کشت خالص دارد، و توانایی قارچ های آربوسکولار مایکوریزال را تقلید مـی‌کنـد، پنجـره جدیـدی بـرای افـزایش تولیـد متابولیت‌های ثانویه با منشاء گیاهی در محیط کشـتی کـه دارای ایـن قارچ به عنوان الیسیتور می‌باشد، باز شده اسـت. یکـی از راهکارهـای ایده‌آل برای تولید پودوفیلوتوکسین، استفاده از سلول‌ها یا بافـت‌هـای گیاهی با رشد سـریع و راحـت در محـیط کشـت حـاوی لیگـنن بـالا می‌باشند. مشخص شده اسـت کـه گونـه قـارچی (*P.indica* حـاوی لیگنین) برای بهبود تولید پودوفیلوتوکسین در محـیط کشـت سـلولی گیاه مناسب است. این امر می‌تواند تکنیک مناسبی در تولیـد تجـاری متابولیت‌های ثانویه با منشاءگیاهی ایجاد کند (Bonfante, 2009).

در بررسی اثر الیسیتورها در میـزان تجمـع آلکالوییـدها، محققـین نشان دادند که پس از گذشت پنج تا ده ساعت از اضافه کردن قـارچ *Botrytis* sp. به کشت سوسپانسـیون خشـخاش، میـزان سـنگویی نـارین (Sanguinarine) آن، بـه طـرز چشـمگیری افـزایش یافـت (Facchini *et al*., 1996). هر یک از الیسیتورهای قارچی می‌تواننـد تاثیرات متفاوتی روی گیاهـان دارویـی مختلـف داشـته باشـد (Xin). بنابراین، فوزاریوم، مخمر، و گونه پیتیوم اگرچه می‌توانند برای افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی مختلـف اسـتفاده شـوند، ولـی ممکن است بهترین الیسیتور برای القای یک متابولیت ثانویـه خـاص نباشند به بیانی دیگر می‌توان گفت برای سـنتز متابولیـت در گیاهـان دارویی از الیسیتورهای قارچی مختلفی استفاده می‌شود (Bonfante, 2009; Mohammadi Farsani *et al*., 2014).

اندوفیت‌ها (قارچ‌ها و باکتری‌ها) میکروارگانیسم‌هایی هسـتند کـه بدون آسیب آشکار و اثرات منفی بر گیاه درون بافت هـای آن زنـدگی می‌کنند و در تمامی نقاط دنیا حضور دارند و دارای تنوع بالای زیستی هستند و در بسیاری از گونه‌های گیاهی بررسی شده یافت شده اند که به عنوان یک منبع بالقوه برای ترکیبات طبیعی زیسـت فعـال جهـت استفاده در پزشکی، کشاورزی و صنعت شناخته شده‌انـد. شـایان ذکـر است که از حدود ۳۰۰ هزار گونه گیاهی موجود بر روی زمین هرگیـاه به صورت تکی، میزبان یک یا چند اندوفیت است. با این وجـود تعـداد انگشت شماری از آن‌ها شناسایی شده‌اند و برخـی انـدوفیت‌هـا سـنتز کننده‌های ترکیبات شیمیایی در درون گیاهان هستند (Bacon *et al*., 1977).

یک اندوفیت ممکن است قادر به تولید چندین متابولیت باشد (Li

(*et al*., 2008). در نتیجه توجه به نقش اندوفیت‌ها در تولید متابولیت‌های جدید جهت استفاده در پزشکی در حال افزایش است. تعداد بسیار کمی از اندوفیت‌ها تاکنون بررسی شده است. اخیراً چندین گروه تحقیقاتی به ارزیابی و توضیح پتانسیل این میکروارگانیسم‌ها و کاربرد آن ها در فرایندهای بیوتکنولوژیک تحریک شده و بر تولید ترکیبات زیست فعال از آن‌ها متمرکز شده‌اند. مطالعات نشان داد تولید مواد زیست فعال به وسیله اندوفیت‌ها به تکامل این میکروارگانیسم‌ها وابسته است که ممکن است با گیاهان میزبان در اطلاعات ژنتیکی سهیم شده باشند، که به آن ها اجازه می‌دهد با میزبان خود بهتر سازگار شوند و برخی اعمال مانند سنتز ترکیبات شیمیایی را درون این گیاهان انجام دهند (Seifi *et al*., 2014). در این پژوهش اثرات اندوفیت قارچی و نقش الیسیتوری آن روی وضعیت سلول و سنتز متابولیت‌ها در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی، تغییرات میزان متابولیت‌های فنول، فلاونوئید و آنتی‌اکسیدان مورد آزمایش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تاثیر اندوفیت قارچی *Alternaria solani*، *Setosphaeria rostrata* و *Fusarium* sp. به عنوان الیسیتور زیستی بر تغییر متابولیت ثانویه به محیط کشت سوسپانسیون سلولی اضافه شد. در این مطالعه آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در دو عامل (عامل اول هورمون‌های گیاهی با دو غلظت و عامل دوم عصاره قارچ اندوفیت به صورت جداگانه و در ترکیب با هم-دیگر) انجام شد.

تولید کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی تحت تیمار هورمون

در این مرحله ابتدا بذور هندوانه ابوجهل از مناطق مورد مطالعه جمع‌آوری و به مدت ۱۰ ثانیه در الکل خالص غوطه‌ور شدند، پس از آن بذرها به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلرید سدیم ۱۰ درصد قرار گرفته و در پایان، سه مرتبه هر بار به مدت ۱۰ دقیقه با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شد. سپس بذرها تحت شرایط استریل به پتری دیش حاوی محیط کشت MS (Murashige and Skoog medium) (۳ درصد ساکاروز، ۰/۸ درصد آگار) منتقل شد و برای جوانه‌زنی در یک انکوباتور مناسب قرار داده شدند. بعد از جوانه‌زنی و تولید برگچه، قطعاتی با سطح تقریبی ۱ میلی‌متر مربع از برگ‌های اولیه جدا و برای کالوس‌زایی به پتری دیش‌های حاوی محیط MS (۳ درصد ساکاروز، ۰/۸ درصد آگار)، با دو سطح 1mg 2,4- D + 1mg BA و 1mg 2,4- D + 1mg kin منتقل گردید و به مدت سه هفته در یک انکوباتور مناسب قرار داده شد. سپس از کالوس‌های تولید شده مقدار ۳ گرم را جدا نموده و در ارلن های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LS (دارای نمک‌های MS) انتقال داده شد. قسمت سر ارلن‌ها توسط دولایه فویل آلومینیومی استریل بسته و به مدت ۳ هفته بر روی شیکر دورانی با سرعت ۱۳۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. در این مرحله پس از هر ۷ روز که غلظت سوسپانسیون‌ها زیاد شده و گرانروی پیدا کردند. واکشت‌های متوالی انجام گرفته و بهترین ترکیب هورمونی از نظر سرعت رشد، کیفیت ظاهری و یکنواختی سوسپانسیون انتخاب گردید. سوسپانسیون‌های رشد کرده و مطمئن از نظر کیفیت و عدم آلودگی باکتریایی و قارچی، انتخاب و به زیر هود لامینار منتقل شدند سپس ارلن‌های حاوی سوسپانسیون درون قیف بوخنر دارای کاغذ صافی ریخته شده و آب آن توسط پمپ خلاء تخلیه گردید. از توده سلولی موجود به میزان ۱ گرم برداشته و درون ارلن‌های حاوی ۱۳ میلی‌لیتر محیط کشت تازه ریخته و درب ارلن‌ها با فویل آلومینیومی بسته شد. در نهایت ارلن‌ها بر روی شیکر انکوباتور با همان سرعت و دمای قبلی قرارگرفته و در هر بار واکشت کردن، تا حد امکان از انتقال ذرات درشت کالوس ایجاد شده در سوسپانسیون قبلی به محیط جدید خودداری گردید (Salaripour *et al*., 2015).

تهیه الیسیتور زیستی (اندوفیت قارچی)

سه اندوفیت قارچی *Alternaria solani*، *Setosphaeria rostrata* و *Fusarium* sp. به‌طور مجزا به محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) منتقل و به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. از کشت‌های ۷ روزه، ۱ سانتی‌متر مربع میسلیوم جدا و در ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع PDB (Potato Dextrose Broth) تلقیح شدند. سلول‌های کشت شده را در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در ۵۰۰ میلی‌لیتر فلاسک ارلن مایر نگه‌داری شد و برای ۷ روز در ۱۲۰ دور در دقیقه روی شیکر قرار داده شد. سپس سلول‌های قارچی را جدا و در دمای ۶۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید. پودر حاصل از سلول‌های خشک شده در آب حل (۱۰ گرم در لیتر) و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو گردید (Esmaeilzadeh Bahabadi and Sharifi, 2014). عصاره این سلول‌ها در نهایت به عنوان الیسیتور زیستی، برای بررسی تغییر در میزان متابولیت ثانویه استفاده گردید.

اندازه‌گیری میزان رشد سلول‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی قبل و بعد از اعمال عصاره‌ی قارچی

برای اندازه گیری وزن خشک (DW) کشت سوسپانسیون سلولی، کشت سوسپانسیون با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی از سلول‌های آن جدا شد. سلول‌ها روی

کاغذ صافی قرار گرفتند تا آب اضافی آن‌ها خارج شود. سپس نمونه‌ها در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شده و وزن خشک توده سلولی قبل و بعد از اعمال الیسیتور زیستی اندازه‌گیری شد (Singleton and Rossi, 1965).

تهیه عصاره متانولی از سوسپانسیون سلولی

تهیه عصاره متانولی با استفاده از روش سینگلتون و روسی انجام شد (Singleton and Rossi, 1965). به ۵۰ میلی‌گرم از سلول‌های تکثیر یافته در سوسپانسیون، ۲/۵ میلی‌لیتر متانول اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در فریزر نگه‌داری شدند. سپس نمونه‌ها در ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. درنهایت محلول رویی تا زمان استفاده در دمای ۲۲- درجه سانتی‌گراد، در یخچال، نگهداری شد.

فنول کل

فنول کل توسط شناساگر فولین سیوکالتو و با استفاده از روش (Slinkard and Singleton, 1977) مشخص گردید. یک میلی‌لیتر متانول به یک میلی‌لیتر از عصاره‌های متانولی اضافه شد. سپس مخلوط فوق با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر و یک میلی‌لیتر شناساگر فولین مخلوط گردید. بعد از مدت زمان ۳ دقیقه، ۳ میلی‌لیتر Na_2CO_3 دو درصد به آن اضافه شد و این مخلوط به مدت ۲ ساعت شیک شد. میزان جذب در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد توسط غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از محلول گالیک اسید تهیه گردید. مقدار فنول کل معادل با میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن تر بیان شد.

فعالیت آنتی‌اکسیدان

دو میلی‌لیتر متانول خالص به ۱ میلی‌لیتر از عصاره‌ها اضافه شد. عصاره‌ی حاصل با ۱۱۰۰۰ دور و به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید تا کاملاً شفاف شود. قرائت در چهار زمان صفر، ۱۵ دقیقه، ۳۰ دقیقه و ۴۵ دقیقه انجام گردید. در واقع تا زمان ثابت شدن عدد قرائت ادامه یافت. قبل از شروع خوانش ابتدا با متانول خالص بلانک شد، سپس داخل کووت ۱۹۰۰ میلی‌لیتر DPPH ریخته شده و در طول موج ۵۱۷ نانومتر عدد اسپکتروفتومتر قرائت گردید، سپس داخل همان کووت ۱۰۰ میکرولیتر عصاره اضافه شد و ۳ بار پیپت گردید تا کاملاً مخلوط شوند و عدد قرائت شد. همان عصاره در جای تاریکی قرار داده شد تا در زمان‌های ذکر شده در بالا دوباره قرائت گردید (Amiri, 2020; Şahin *et al*., 2004).

فلاونوئید

میزان فلاونوئید کل با روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد. به یک میلی‌لیتر از هر عصاره، ۱۰ میلی‌لیتر متانول اضافه شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره حاصل، آب مقطر اضافه شد تا حجم ۵ میلی‌لیتر به دست آید. سپس به محلول حاصل، ۰/۳ میلی‌لیتر $NaNO_2$ پنج درصد اضافه شد و پس از ۵ دقیقه، ۰/۶ میلی‌لیتر $AlCl_3$ ده درصد اضافه گردید. در نهایت ۲ میلی‌لیتر NaOH ۱ مولار و ۲ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و شدت جذب در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین به دست آمد (Chang *et al*., 2002).

آنالیز آماری

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو عامل، عامل اول ترکیب هورمونی با دو سطح 1mg 2,4- D + 1mg BA و 1mg 2,4- D + 1mg kin وعامل دوم عصاره‌ی قارچی (F=*Fusarium* sp., A=*Alternaria solani*, S= *Setosphaeria rostrata*) به صورت جداگانه و در ترکیب با یکدیگر (هشت سطح A, F, S,A+F, A+S, F+S,A+F+S، شاهد) با سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS.9.4 انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که برهمکنش ترکیب هورمونی و عصاره قارچی بر صفات وزن خشک سلول، تولید میزان فنول و فعالیت آنتی اکسیدانی در سطح احتمال یک درصد و بر صفت میزان تولید فلاونوئید در سطح احتمال پنج درصد معنی دار بود. (جدول ۱) مربوط به نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای هورمون گیاهی و عصاره قارچی بر صفات اندازه‌گیری شده است.

اثر برهمکنش ترکیب هورمونی و عصاره قارچ‌های اندوفیت بر رشد سلول‌ها درکشت سوسپانسیون سلولی

مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار تنظیم کننده رشد و عصاره قارچی نشان داد که بیشترین میزان رشد سلول در ترکیب تیماری هورمونی (1mg 2,4-D + 1mg BA) و عصاره توام سه قارچ *Alternaria solani*، *Setosphaeria rostrata* و *Fusarium* sp. بود که نسبت به شاهد افزایش ۵۲ درصدی را نشان داد. پس از آن ترکیب تیماری هورمون (1mg 2,4-D + 1mg BA) و عصاره توام دو قارچ (*Fusarium* sp.+ *solani Alternaria*) بهترین اثر را داشت (شکل ۱).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای هورمون گیاهی و عصاره قارچی بر صفات اندازه گیری شده در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی هندوانه ابوجهل

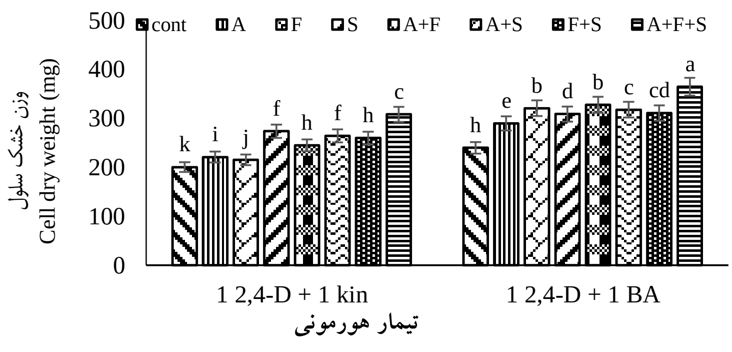
Table 1– The ANOVA results for the effect of plant hormone and fungal extracts on the measured traits in the cell suspension culture of *Citrullus colocynthis* (L). Schrad.

منابع تغییرات Source of Variations	درجه آزادی d. f	میانگین مربعات Mean squares: وزن خشک سلول Cell dry weight	محتوی فلاونوئید Flavonoids content	محتوی فنول Phenol content	فعالیت آنتی‌اکسیدانتی Antioxidant activity
ترکیب هورمونی Hormonal composition	1	45264.083***	35.362***	526.678**	875.521**
عصاره قارچی Fungal extract	7	6686.369**	4.513**	63.830***	190.592**
ترکیب هورمونی × عصاره قارچی Hormonal composition× Fungal extract	7	798.750**	0.359**	24.830**	31.045**
خطا Error	32	12.6	1.62	3.76	5.76
ضریب تغییرات C.V (%)	-	19.25	14.79	13.19	17.49

*، **، *** به‌ترتیب در سطح، ۵، ۱ و ۰/۱ درصد معنی‌دار می‌باشد.

*, **, *** and are significant, significant at the probability level of 5, 1 and 0.1%, respectively

کمترین میزان آن در تیمار ترکیب هورمونی 1mg 2,4-D + 1mg Kin و بدون تلقیح با قارچ مشاهده شد. در بررسی علت تاثیر الیسیتورها بر افزایش میزان متابولیت ثانویه می‌توان گفت که تاثیر الیسیتور روی افزایش و یا کاهش متابولیت ثانویه به عوامل متعددی بستگی دارد که یکی از این عوامل نوع الیسیتور است و در مورد الیسیتور قارچی، نوع عصاره قارچی است. عصاره قارچ‌های مختلف روی گیاهان مختلف و متابولیت‌های مختلف تاثیر متفاوتی دارند به عنوان مثال، قارچ‌هایی مانند *Penicillium citrium* و *P. spimulorum* باعث افزایش تولید آجمالیسین در کشت سلول *C. roseus* شده‌اند و عصاره قارچ *Absidia cristata* باعث افزایش تولید سرپنتین می‌شود درحالی‌که عصاره قارچ *Mucor* اثر ضعیفی دارد (Moreno, 1996). عامل دیگر موثر، خود متابولیت‌ثانویه است یک نوع عصاره قارچ و یک نوع الیسیتور ممکن است تاثیر متفاوتی روی دو متابولیت ثانویه مختلف داشته باشد.



F= *Fusarium* sp. A= *Alternaria solani* S= *Setosphaeria rostrata*

شکل ۱- اثر برهمکنش هورمون (1mg 2,4- D + 1mg BA و 1mg 2,4- D + 1mg kin) × عصاره قارچ اندوفیت بر میزان وزن خشک سلول‌ها درکشت سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی هندوانه ابوجهل

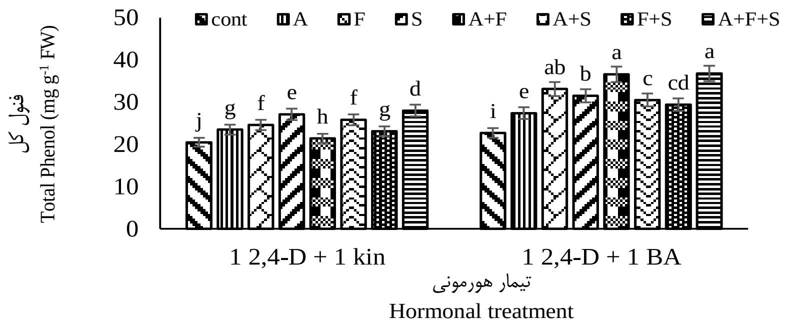
Figure 1- The interaction effect of hormone composition (1mg 2,4- D + 1mg BA and 1mg 2,4- D + 1mg kin)-× endophytic fungus extract on the cell dry weight in thecell suspension culture of *Citrullus colocynthis* (L). Schrad. (LSD, *p≤0.05*).

به طور مثال در بررسی اثر عصاره قارچی *phytium* بر میزان آلکالوئید آجمالیسین، فنول، ترپنوئیدها و آنزیم‌های مسیر بیوسنتز فنول ترپنوئید در ریشه موئین پروانش، باعث افزایش آجمالیسین ولی کاهش میزان فنول، ترپنوئیدها و کاهش فعالیت آنزیم‌های مسیر فنول ترپنوئیدی شد (Moreno, 1996) مدت زمانی که سلول‌ها در معرض الیسیتور قرار می‌گیرند نیز نقش مهمی در میزان تولید متابولیت‌های ثانویه دارد.

اثر برهمکنش ترکیب هورمونی و عصاره قارچ اندوفیت بر محتوی متابولیت‌های ثانویه

فنول

مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار تنظیم کننده رشد و عصاره قارچی نشان داد که بیشترین میزان فنول در ترکیب تیمار هورمونی 1mg 2,4-D + 1mg BA و تلقیح توام سه قارچ بود و پس از آن *Fusarium* sp.+*Alternaria solani* بهترین ترکیب تیماری بود (شکل ۲). همچنین کمترین میزان آن در تیمار ترکیب هورمونی 1mg 2,4-D + 1mg Kin و بدون تلقیح با قارچ مشاهده شد. همچنین علت افزایش میزان فنول توسط عصاره قارچی ممکن است به دلیل فعال شدن مسیرهای دفاعی گیاه توسط ترکیبات دیواره سلولی قارچ باشد. فعال‌سازی سیستم دفاعی گیاه منجر به ترشح آنزیم‌های هیدرولیتیک شده که تصور می‌شود نقش مهمی در فعالیت دفاعی گیاه دارند (Bahorun *et al.*, 2003). احتمال دیگری که در مکانیسم اثر عصاره قارچی بر افزایش متابولیت ثانویه دارد این است که ترکیبات عصاره قارچ با تاثیر بر بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی فنول و افزایش فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی باعث افزایش تولید ترکیبات فنولی شده است. در تحقیق کیم و همکاران (Kim *et al.*, 2000)، الیسیتور زیستی باعث افزایش بیان ژن‌ها در سوسپانسیون سلولی برنج شد و شناسایی ترکیبات فعال عصاره‌های قارچی در درک مکانیسم برهم‌کنش سلول‌های گیاهی و الیسیتورهای قارچی و سایر پاسخ‌های دفاعی، کمک خواهد کرد.



F= *Fusarium* sp. A= *Alternaria solani*   S= *Setosphaeria rostrata*

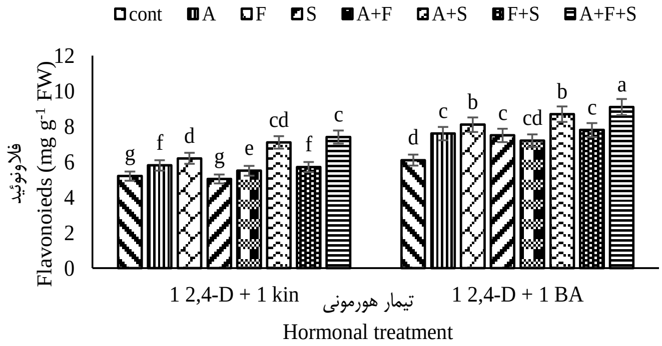
شکل ۲- اثر متقابل ترکیب هورمونی (1mg 2,4- D + 1mg BA و 1mg 2,4- D + 1mg kin) × عصاره قارچ اندوفیت بر محتوی فنول درکشت سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی هندوانه ابوجهل

Figure 2- The interaction effect of hormone compositions (1mg 2,4- D + 1mg BA and 1mg 2,4- D + 1mg kin) × endophytic fungus extract on the phenol content of cell suspension culture of *Citrullus colocynthis* (L). Schrad. (LSD, $p \leq 0.05$).

فلاونوئید

مقایسه میانگین اثر متقابل تنظیم کننده رشد و عصاره قارچ نشان داد که بیشترین میزان فلاونوئید در ترکیب تیمار هورمونی 1mg 2,4.D + 1mg BA و تلقیح توام سه قارچ بود و پس از آن تیمار ترکیب هورمونی 1mg 2,4.D + 1mg BA و تلقیح توام *Setosphaeria rostrata* +*Alternaria solani* و نیز تیمار ترکیب هورمونی 1mg 2,4.D + 1mg BA با *Setosphaeria rostrata* بود. کمترین میزان آن در تیمار ترکیب هورمونی 1mg 2,4.D + 1mg Kin و بدون تلقیح با قارچ مشاهده شد (شکل ۳). در کشت سلولی کتان سفید حضور الیسیتورهای قارچی در زمان‌های مختلف اثر متفاوتی بر میزان لیگنان دارد. به گونه‌ای که بیشترین میزان پدوفیلوتوکسین و لاریسی رزینول در سلول‌های کتان سفید تیمار شده با الیسیتورهای قارچی *Fusarium graminearum*، *Rhizoctonia silani*، *Rhizopus stolonifera* و *Trichoderma viride* در روز پنجم بعد از تیمار و عصاره قارچ *Sclerontinia sclerotiorum* در روز سوم پس از تیمار مشاهده شد (Esmaeilzadeh Bahabadi and Sharifi, 2014). تنوع برهمکنش هر قارچ با سلول گیاهی به‌واسطه اثرات خاص و متنوع محرک‌های قارچی متفاوت است و بنابراین پاسخ‌های دفاعی سلول گیاهی متناسب با نوع

برهمکنش است. افزایش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانتی در تحقیق حاضر ممکن است به دلیل وجود ترکیبات ناشناخته مثل اینـدول استیک اسید، فلاونوئیدها و آنزیم‌های دیواره سلولی مانند سلولاز و زایلاناز و ترکیباتی مثل الیگوساکاریدها، هورمون‌ها، آنزیم‌ها و پپتیدها باشد که می‌توانند به‌عنوان محرک عمل کنند، باشد (Kumar *et al*., 2016).



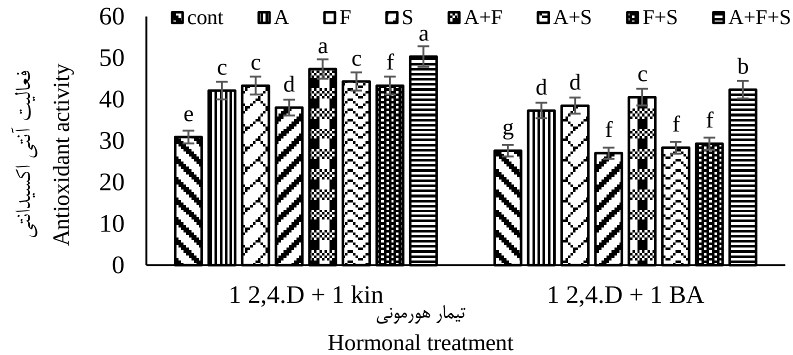
F= *Fusarium* sp. A= *Alternaria solani* S= *Setosphaeria rostrata*

شکل ۳- اثر برهمکنش ترکیب هورمونی (1mg 2,4- D + 1mg BA و 1mg 2,4- D + 1mg kin)× عصاره قارچ اندوفیت بر محتوی فلاونوئید در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی هندوانه ابوجهل

Figure 3- The interaction effect of the hormonal compositions (1mg 2,4- D + 1mg BA and 1mg 2,4- D + 1mg kin) × endophytic fangus extract on the flavonoid content in the cell suspension culture of *Citrullus colocynthis* (L). Schrad. (LSD, *p≤0.05*).

فعالیت آنتی‌اکسیدانتی

بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانتی در تیمار هورمونی 1mg 2,4-D + 1mg Kin و تلقیح توام سه قارچ مشاهده شد که باعث افزایش معنی دار ۶۲/۷٪ نسبت به شاهد شد (شکل ۴). در گیاهان تحت تیمار هورمونی 1mg 2,4-D + 1mg BA، نیز تلقیح با تیمار توام سه قارچ سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنتی‌اکسیدانتی در مقایسه با شاهد شد. پس از آن تلقیح توام *Alternaria* + *Fusarium* sp. *solani* بهترین ترکیب در هر دو محیط کشت بود (شکل ۴). کمترین میزان آن در تیمار ترکیب هورمونی 1mg 2,4-D + 1mg BA و بدون تلقیح با قارچ مشاهده شد. نقش فعالیت آنتی اکسیدان در افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های غیر زیستی و همچنین اثرات مثبت آن‌ها در سلامت انسان در موارد متعدد به ثبت رسیده است (Alikhani *et al*., 2020).



F= *Fusarium* sp. A= *Alternaria solani* S= *Setosphaeria rostrata*

شکل ٤- اثر متقابل ترکیب هورمونی (1mg 2,4- D + 1mg BA و 1mg 2,4- D + 1mg kin) و قارچ اندوفیت بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانتی در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی هندوانه ابوجهل

Figure 4- The interaction effect of the hormonal composition (1mg 2,4- D + 1mg BA and 1mg 2,4- D + 1mg kin) × endophytic fangus extracts on the antioxidant activity amount in the cell suspension culture of *Citrullus colocynthis* (L). Schrad. (LSD, *p≤0.05*)

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تیمار هورمون و عصاره قارچی نشان داد که با افزودن عصاره به محیط، رشد سلولی افزایش می‌یابد. نتایج نشان داد که ترکیب سه نوع قارچ اندوفیت *Alteynaria solani*، *Setosphaeria rostrata* و *Fusariim* sp. با یکدیگر منجر به افزایش معنی‌داری در وزن خشک سلول‌ها نسبت به تیمار شاهد می‌شود، همچنین افزایش رشد سلول‌ها در مقایسه با تیمار شاهد، نسبت به کاربرد عصاره قارچی به تنهایی نیز مشاهده شد. میزان تولید متابولیت‌ها در سلول‌هایی که تحت تیمار عصاره قارچی (الیسیتور قارچی) قرارگرفته بودند بطور معنی‌داری بیشتر از متابولیت‌های شاهد بود. با توجه به نتایج این آزمایش، استفاده ترکیبی از سه محرک عصاره قارچی، به‌عنوان بهترین تیمار به منظور تولید متابولیت‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه هندوانه ابوجهل می‌باشد.

منابع

1. Amiri, H. (2020). Identification of ingredients and evaluation of antioxidant effects of essential oil and methanolic extract of *Salvia multicaulis* Vahl. *Quarterly Journal of Medicinal Plants*, Eleventh year, volume 1, special issue number 8.
2. Alikhani, O., Abbaspour, H., & Motevalizadekakhki, A. (2020). Effects of methyl jasmonate on cadmium accumulation, antioxidant capacity and some physiological traits of wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology) 32*(4): 886-897. https://doi.org/10.32404/rean.v6i3.3322.
3. Bacon, C.W., Porter, J.K., Robbins, J.D., & Luttrell, E.S. (1977). Epichloe typhina from toxic tall fescue grasses. *Applied and Environmental Microbiology 34*(5): 576-581. https://doi.org/10.1128%2Faem.34.5.576-581.1977.
4. Bahorun, T., Aumjaud, E., Ramphul, H., Rycha, M., Luximon- Ramma, A., Trotin, F., & Aruoma, O.I. (2003). Phenolic constituents and antioxidant capacities of Crataegus monogyna (Hawthorn) callus extracts. *Food/Nahrung 47*(3): 191-198. https://doi.org/10.3390%2Fnu7095361.
5. Bensaddek, L., Villarreal, M.L., & Fliniaux, M.A. (2008). Induction and growth of hairy roots for the production of medicinal compounds. *Electronic Journal of Integrative Biosciences 3*(1): Special Issue on Hairy Roots (A. Lorence and F. Medina-Bolivar, co-editors)), 2-9.
6. Bonfante, P. (2009). *Symbiotic fungi: principles and practice*. vol. 18.
7. Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., & Chern, J.C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis 10*(3). https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748.
8. Esmaeilzadeh Bahabadi, P. (2011). *The effect of fungal eliminators on podophyllotoxin and gene expression and activity of technical enzymes alanine ammonia lyase and cinnamyl alcohol dehydrogenase in Linum album*, Ph.D. thesis, Tarbiat Modares University, Faculty of Biological Sciences, Tehran, Iran.
9. Esmaeilzadeh Bahabadi, P. & Sharifi, M. (2014). Physiological responses of isolated white flax culture cells (*Linum album Kotschy ex Boiss*) to fungal eliminators. *Plant Biology of Iran 17*(5).
10. Bahabadi, S. E., Sharifi, M., Safaie, N., Murata, J., Yamagaki, T., & Satake, H. (2011). Increased lignan biosynthesis in the suspension cultures of Linum album by fungal extracts. *Plant Biotechnology Reports* 5: 367-373. https://doi.org/10.1007/s11816-011-0190-3.
11. Facchini, P.J., Penzes, C., Johnson, A.G., & Bull, D. (1996). Molecular characterization of berberine bridge enzyme genes from opium poppy. *Plant Physiology 112*(4): 1669-1677. https://doi.org/10.1104%2Fpp.112.4.1669.
12. Kim, C.Y., Lee, S.H., Park, H.C., Bae, C.G., Cheong, Y.H., Choi, Y.J., & Cho, M.J. (2000). Identification of rice blast fungal elicitor-responsive genes by differential display analysis. *Molecular Plant-microbe Interactions 13*(4): 470-474. https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.4.470.
13. Kumar, P., Chaturvedi, R., Sundar, D., & Bisaria, V.S. (2016). Piriformospora indica enhances the production of pentacyclic triterpenoids in *Lantana camara* L. suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 125: 23-29. https://doi.org/10.1007/s11240-015-0924-y.
14. Lam, K.S. (2007). New aspects of natural products in drug discovery. *Trends in Microbiology 15*(6): 279-289. http://doi.org/10.1016/j.tim.2007.04.001.
15. Li, E., Jiang, L., Guo, L., Zhang, H., & Che, Y. (2008). Pestalachlorides A–C, antifungal metabolites from the plant endophytic fungus Pestalotiopsis adusta. *Bioorganic & Medicinal Chemistry 16*(17): 7894-7899. http://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.07.075.
16. Mohammadi Farsani, M., & Qasemi Pir Balouti, A. (2014). Application of elicitors in increasing the production of secondary metabolites in cell and plant culture suspension. *Journal of Herbal Medicines 5*(3): 120-113.

17. Moreno, P.R., Poulsen, H., van der Heijden, C., & Verpoorte, R. (1996). *Enzyme Microboqy Technology* 18: 99.
18. Şahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., & Özer, H. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. vulgare in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control 15*(7): 549-557. http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2003.08.009.
19. Salaripour, S., Karimzadeh, Q., Moeini, A., & Torkash Esfahani, S. (2015). Production of cell suspension from Eastern tobacco cultivars (*Nicotiana tabacum*) for cell line production. *Biotechnology in Agriculture 4*(2).
20. Seifi, M., Nazeri, S., Soltani, J., & Chehregani Rad, A. (2014). Comparison of DBAT gene sequences. At the nucleotide and amino acid levels. In yew species and endophytic fungi. *Journal of Cell and Tissue (Scientific Research) 2*(4): 203-197.
21. Singleton, V.L., & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture 16*(3): 144-158.
22. Slinkard, K., & Singleton, V.L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture 28*(1): 49-55.
23. Vasconsuelo, A., & Boland, R. (2007). Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science 172*(5): 861-875. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.01.006.
24. Zhai, X., Jia, M., Chen, L., Zheng, C.J., Rahman, K., Han, T., & Qin, L.P. (2017). The regulatory mechanism of fungal elicitor-induced secondary metabolite biosynthesis in medical plants. *Critical Reviews in Microbiology 43*(2): 238-261. http://dx.doi.org/10.1080/1040841X.2016.1201041.
25. Zhao, J., Davis, L.C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances 23*(4): 283-333. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.003.